

学 位 論 文 要 旨

エリシター誘導性防御応答の制御におけるウイルス抵抗性 遺伝子 *N* の遺伝子産物およびイントロンの役割の研究

Study on roles of the gene product and introns of the virus resistance
gene *N* in control of elicitor-induced defense responses

応用生命科学専攻
応用生物化学大講座
多久和夫

タバコモザイクウイルス (TMV) に対する抵抗性遺伝子 *N* をもつタバコは、ウイルス感染またはウイルス複製酵素のヘリカーゼドメインである *p50* と呼ばれるウイルスエリシターの一過的発現によって *N* 遺伝子の発現を上昇させ、細胞死をともし防御応答を誘導することが知られている。また、エリシターに反応したタバコの *N* 転写物量の上昇には *N* タンパク質の関与が示唆されている。

本研究では、エリシター応答性の遺伝子発現上昇における *N* タンパク質および *N* 遺伝子のイントロンの役割を調べた。アグロバクテリウム浸潤法によって、*N* 遺伝子を持たないタバコ品種 (Samsun nn) で、*N* 遺伝子自体の上流領域によって制御される *N* 配列を発現する一過的導入遺伝子発現系を構築した。

N 遺伝子のプロモーターを含む 2.3 kb の上流領域 (NP2.3) およびイントロンを含むコーディング領域の配列 (NP2.3-gN-Int1234: NP2.3-gN) と *p50* の cDNA 配列を共導入し、リアルタイム定量 RT-PCR 法 (qRT-PCR 法) を用いて導入 24, 36, 及び 48 時間後の *N* 転写物量を測定した。その結果、イントロンを有する *N* 導入遺伝子の転写レベルは、導入 36 時間後で急激に増強され、*p50* を共導入しない対照区と比べて *N* 転写物量が約 11 倍に増加し、その後に細胞死を誘導することがわかった。

一方で、イントロンを有する導入遺伝子 NP2.3-gN の翻訳開始点近傍にフレームシフト変異を導入した配列 (NP2.3-gNfs) を用いた場合には、*p50* 共導入下でも 1.5 倍程度の *N* 転写物量の増加しか認められず、細胞死の誘導も観察されなかった。そこで、*p50* に加えて、35S プロモーター制御下の *N* の cDNA 配列 (35S-cN) をさらに共導入して *N* タンパク質を補完した場合の NP2.3-gNfs の発

現量への影響を調べた。qRT-PCR法で解析した結果、*NP2.3-gNfs* 転写物量は導入 36 時間後で急激に増加することが分かった。以上の結果から、エリシター応答性には機能的な Nタンパク質が必要であることが示唆された。

イントロンは、転写を調節するエンハンサーあるいはサプレッサー機能を持つことが多くの事例で報告されていることから、*N* 遺伝子のイントロンもエリシター応答性に関与するシスエレメント機能を有していると仮定し、エリシター応答性におけるイントロンの影響を調べた。*NP2.3* に *cN* を連結した配列 (*NP2.3-cN*) を用いて同様の実験を行ったところ、*p50* 発現下でも *NP2.3-cN* の発現上昇は起こらないことが分かった。*NP2.3-cN* のフレームシフト変異型の導入遺伝子 (*NP2.3-cNfs*) と *p50* の共発現に加えて、*35S-cN* を利用して Nタンパク質を補完した場合、細胞死は誘導されたものの、エリシターに対する急激な応答は見られなかった。以上の結果から、機能的な Nタンパク質の発現だけでは不十分であり、*N* 遺伝子中のイントロンがエリシター応答性において重要な役割を果たしていることが示唆された。

p50 共発現下における *NP2.3-gN* と *NP2.3-cN* の比較を行ったところ、*NP2.3-gN* の場合と比べて *NP2.3-cN* の場合は細胞死の誘導が遅延し、壊死斑の程度も軽減することが分かった。さらに、防御関連遺伝子 (*WRKY1*, *PR1a*, *PR1b*, *Hin1*, および *Hsr203j*) の発現解析を行った結果、*WRKY1*, *PR1b*, *Hin1*, および *Hsr203j* に関しては、*NP2.3-gN* と *p50* の共発現によって発現が急激に上昇するのに対し、*NP2.3-cN* の場合には遅延、減弱していることが示唆された。一方で、*PR1a* に関しては、*NP2.3-gN* と *NP2.3-cN* のいずれにおいても、*p50* 共発現の有無にかかわらず発現上昇がみられたことから、アグロバクテリウム感染に対する非特異的な応答が起こっている可能性が考えられた。以上の結果から、*N* のイントロンは *N* 転写量の急激な増加と関連して、迅速な防御応答の誘導に必要であることが示唆された。

さらに、*35S* 恒常発現プロモーターに制御された、イントロンを有する *N* 導入遺伝子 (*35S-gN*) とイントロンを有しない *N* 導入遺伝子 (*35S-cN*) の転写物量を qRT-PCR 法によって解析した。その結果、*p50* の共発現の有無にかかわらず、*35S-gN* は *35S-cN* よりも転写物量が大きく増強することが示された。このことから、*N* 遺伝子のイントロンには、転写を活性化するエンハンサー機能があることが示唆された。また、エンドポイント PCR 法により転写物の未成熟体の検出を行った結果、*NP2.3-gN* の未成熟体の蓄積量が *p50* の共発現によって増大していることが明らかとなり、転写物量の増大は転写活性化が大きく関与していると考えられた。以上の結果から、*NP2.3* プロモーターのエリシター応答性とは、*N* が *p50* をエリシターとして認識する相互作用によって、イントロンがエンハンサー機能を発揮できるようになる現象である可能性が考えられた。

本研究によって、エリシター応答性の発現上昇および効率的な防御応答の誘導における抵抗性遺伝子のイントロンの新たな機能について明らかにすることができた。